

Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

ELEKTRONENMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG
DES MÄUSENEUROBLASTOMS C 1300
IN VIVO UND IN VITRO

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Andreas Winter

aus Wolfenbüttel

1973



Aus dem II. Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Willy Schwarz

**Elektronenmikroskopische Untersuchung
des Mäuse-neuroblastoms C 1300
in vivo und in vitro**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Andreas Winter
aus Wolfenbüttel

Referent: Professor Dr.med. Hans-Joachim Merker

Korreferent: Professor Dr.med. Jorge Cervós-Navarro



**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin**

Promoviert am: 6. August 1973

Inhaltsverzeichnis

Seite

Einleitung	1
Material und Methodik	4
Befunde	6
Diskussion	12
Zusammenfassung	18
Literaturverzeichnis	
Bildanhang	

Einleitung

Um Wachstum und Differenzierung von Nervengewebe zu studieren, hat sich die Kultivation dieses Gewebes in vitro als nützlich erwiesen. Mit dieser Methode gelingt es, die genetisch fixierten, also genuinen Potenzen einer Zelle bei der Differenzierung unabhängig von anderen möglichen Einflüssen durch das umgebende Gewebe aufzuzeigen. Nervengewebe ist bereits unter verschiedensten Bedingungen kultiviert worden (Lumsden, C.E., 1968). Dabei ergaben sich jedoch während des Wachstums, was die gute Erhaltung des Gewebes anbelangt, zahlreiche technische Schwierigkeiten. Als besonders geeignet für solche Untersuchungen stellten sich Tumoren heraus, die von Zellen des Zentralnervensystems bzw. des Sympathikus ausgehen.

Der hier zu untersuchende Tumor wurde erstmals 1940 am Mäusestamm A/J beobachtet. Seit dieser Zeit, also über einen Zeitraum von mehr als 30 Jahren, wurde er durch subcutane Inoculation von Tumormaterial von Maus zu Maus des gleichen Stammes weitergezüchtet und so mehr als 1000 Tierpassagen hindurch erhalten. In ersten histologischen Untersuchungen (Dunham und Stewart, 1953) wurde er als ein höchst undifferenzierter Rundzelltumor beschrieben, der möglicherweise ein Neuroblastom darstelle, da die beschriebenen Zellen denen des Nebennierenmarks und des Sympathikus ähneln. Heute gibt es an der Richtigkeit dieser Vermutung keinen Zweifel mehr. (Stewart et al., 1959).

Seit man damit begonnen hat, den in vivo Tumor in der Kultur zu züchten, ist bekannt, daß in vitro starke morphologische Veränderungen auftreten. Es bilden sich unter geeigneten Bedingungen Fortsätze bis zu einer Länge von 3 mm aus, die, wie biochemische, physiologische und morphologische Untersuchungen ergaben, denen reifer Nervenzellen ähneln. Es sind Mikrotubuli (Olmstedt et al., 1971), Neurofilamente, "dense core granula" und synapsenähnliche Strukturen (Schubert et al., 1969) mitgeteilt worden.

Ähnliche Differenzierungsvorgänge von primär undifferenzierten Neuroblasten in der Kultur wurden schon wenige

Jahre vorher bei der Züchtung von menschlichen Neuroblastomzellen beobachtet (Goldstein et al., 1964: Auftreten von Neurofilamenten, Anhäufung von Nissl-Substanz, Hypertrophie von Axonen). Durch die sehr schnelle Differenzierung primär undifferenzierter Neuroblasten unter Kulturbedingungen hat sich die Kultivierung von Tumorbiopsiematerial als ein nützliches Hilfsmittel für die Diagnose des kindlichen Neuroblastoms erwiesen.

Nelson et al. (1969) konnten zeigen, daß die morphologisch faßbare Differenzierung der Neuroblastomzellen in vitro auch zu funktionellen Veränderungen führt. Diese Zellen reagieren bei elektrischer Reizung mit Aktionspotentialen. Biochemische und histochemische Untersuchungen haben darüber hinaus Neurotransmitter, das chemische Substrat synaptischer Reizübertragung, nachweisen können (Augusti-Tocco und Sato, 1969; De Lellis et al., 1970; Hermetet, 1972). Durch die quantitative Bestimmung der Enzyme Tyrosin-Hydroxylase und Cholin-Acetyl-Transferase (Blume et al., 1970), Schlüsselenzyme für die Synthese von Adrenalin bzw. Acetylcholin (Elliot et al., 1965) wurde einerseits der Beweis für die Synthese dieser Transmitter in den Neuroblastomzellen selbst erbracht, andererseits konnten quantitative Vergleiche der Syntheserate dieser Substanzen zwischen den Neuroblastomzellen und Gehirnzellen hergestellt werden. So ist der Gehalt an Tyrosin-Hydroxylase im kultivierten Neuroblastom höher, der Gehalt an Cholin-Acetyl-Transferase dagegen niedriger als im Gehirn (Amano et al., 1971).

Weiterhin wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Ausdifferenzierung dieser kultivierten Zellen zu fördern. Besonders hervorzuheben sind dabei die Versuche von K.N.Prasad (1971), der durch die Behandlung mit Dibutyryl-Adenosin-3'-5'-cyklischem-Monophosphat eine stärkere Differenzierung der Neuroblastomzellen ohne wesentliche Beeinträchtigung der Zellteilungsrate erreichen konnte. Als wichtigstes Zeichen

für die Reifung und Differenzierung der Zellen diene neben morphologischen Kriterien der Nachweis eines Anstiegs der Acetylcholinesterase. Dieser Anstieg ist unabhängig von einer Einschränkung der Zellteilungsrate (Furmanski et al., 1971, Schubert et al., 1971), die ebenfalls mit einer Erhöhung der Acetylcholinesterase einhergeht (Blume et al., 1970). Stärkere Zelldifferenzierungen wurden ebenfalls beobachtet, wenn man den Tumor ohne Serum im Medium wachsen ließ (Seeds et al., 1970), bei Zugabe von 5-Bromdeoxyuridin zum Medium (Schubert et al., 1971) oder wenn die Zellen einer Röntgenbestrahlung ausgesetzt sind (Prasad et al., 1971).

Ebenfalls ist das Auftreten von Viruspartikeln im Mäuse-neuroblastom C 1300 bekannt (Schubert et al., 1969, Prasad et al., 1970, Myers et al., 1971). Übereinstimmend wird berichtet, daß sich die Viren auf der äußeren Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums und in deren Hohlräumen befinden. Über die Bedeutung der Viren in bezug auf die Genese des Tumors gibt es dagegen unterschiedliche Ansichten. Besonders umstritten ist dabei die Frage, ob es sich bei den hier beobachteten Viruspartikeln lediglich um Begleitviren handelt, wie sie in vielen Tumoren vorkommen (Klima, 1967), oder ob die Viren selbst tumorinduzierend wirken.

K.N. Prasad gelang es, den Tumor mit Hilfe eines zellfreien Extraktes, den er durch Ultrazentrifugation und anschließender Filtration (Millipore) aus in vivo Tumoren herstellte, auf Mäuse des Stammes A/J zu übertragen. Dabei zeigten die durch den zellfreien Extrakt erzeugten Tumoren, was morphologisches und biochemisches Verhalten anbetrifft, weitgehende Übereinstimmung mit den ursprünglichen Tumoren. Myers et al. konnten dagegen in gleichangelegten Serienversuchen mit jungen Mäusen in keinem Falle den Tumor mit Hilfe eines zellfreien Extraktes übertragen. In einem anderen Versuch (Zimmermann, 1972) gelang es, den Tumor durch Inoculation von hoch differenzierten Zellen eines über lange Zeit in der Kultur gehaltenen Neuroblastoms in Mäuse des Stammes A/J zu induzieren.

Während also bereits eine Reihe wichtiger Ergebnisse über diesen Tumor vorliegt, steht unseres Wissens eine genaue Beschreibung der ultrastrukturellen Morphologie noch aus. Lediglich Schubert et al. (1969) haben bislang eine knappe elektronenmikroskopische Darstellung der in vivo und in vitro Tumoren gegeben.

Material und Methodik

Der Neuroblastomtumor C 1300 wurde auf Mäusen des Stammes 0102 A/J s.c. passagiert, mit einer Frequenz von 5 bis 7 Tagen und zur Kultivierung den Mäusen nach deren Tötung durch Dekapitation unter aseptischen Bedingungen entnommen und in Hanks BSS gespült.

Deckglaskultur: Ca. 1 mm große Tumorfragmente wurden in einem Clot aus 0,05 ml Hühnerplasma (Difco) pro Fragment unter MEM + 10 % Kälberserum (Bio-Cult Laboratories, Glasgow) auf einem Deckglas in 60 mm Falcon-Schalen bei 37°C, 5 % CO₂ in Luft und feuchter Atmosphäre kultiviert. Die Kultivationsdauer betrug 5 und 7 Tage ohne Mediumwechsel. Für die Lichtmikroskopie wurden die Kulturen in 10 % Formalin fixiert und in Giemsa-Lösung gefärbt, für die Elektronenmikroskopie im Glutaraldehyd-Paraformaldehyd-Gemisch nach Karnovski fixiert, vom Deckglas abgelöst, nachfixiert in 1 % OsO₄, acetontrocknet und in Mikropal (Ferak) eingebettet.

Organkultur: Wir verwandten eine modifizierte Trowell-Kultivierung (Trowell, 1959). Ca. 1 mm große Tumorfragmente wurden auf einem Glasfaserfilter (Sartorius) auf einer Brücke aus rostfreiem V₄A-Stahlnetz in der Gas-Medium-Phasengrenze in 60 mm Falcon-Schalen bei 37°C, 5 % CO₂ in Luft und in feuchter Atmosphäre kultiviert. Medium: MEM + 10 % Kälberserum (Bio-Cult), Kultivationsdauer 5, 7 und 10 Tage. Fixierung nur für die Elektronenmikroskopie in Karnovski-Gemisch und anschließend in 1 % OsO₄.

Monolayer-Kultur: Die Dissoziation des Tumorgewebes in Einzelzellen erfolgte in 0,15 %-iger Pronaselösung (Serva) in CMF (Moscona, 1961) für 30 min. bei 37°C. Die Zellsuspension wurde in Hanks BSS gewaschen, dann in Vierkantflaschen ausgesät. Medium: MEM + 10 % Kälberserum (Bio-Cult), Inkubation bei 37°C. Die Fütterung erfolgte anfangs wöchentlich. Nach 5 Wochen konnten

die Zellen erstmals umgesetzt werden (Trypsin, 0,2 % in CMF). Das Zellwachstum steigerte sich langsam, so daß der Zeitraum zwischen zwei aufeinander folgenden Fütterungen bzw. Passagen nach und nach verkürzt werden mußte. Die Zellen wurden dann in der 40. Passage alle 2 Tage gefüttert und alle 3 bis 5 Tage umgesetzt. Zur Lichtmikroskopie ließen wir die Zellen auf Deckgläschen wachsen, die dann mit 10 % Formalin fixiert und mit Giemsa-Lösung gefärbt wurden. Zur Elektronenmikroskopie wurden die Zellen mit Karnovski-Gemisch am Glas fixiert, anschließend abgeschabt, nachfixiert in 1 % OsO_4 und dann in 2 %-igem Agar-Agar eingebettet. Die Entwässerung erfolgte in Aceton, die Einbettung in Mikropal. -

Dem Medium gaben wir in allen Fällen als Antibiotikazusatz 50 IE/ml Penicillin und 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin zu.

Von den mikropaleingebetteten Kulturen wurden in einigen Fällen 1 μ dicke Schnitte, gefärbt in 50 %-iger Giemsalösung bei 60°C, zur Orientierung und Lichtmikroskopie angefertigt. Die Herstellung der Dünnschnitte erfolgte an LKB- und Reichert-Mikrotomen. Kontrastierung: Uranylacetat/Bleicitrat. Aufnahmen: Siemens-Elmiskope I und I a.

Befunde

Bei der elektronenmikroskopischen Betrachtung des in vivo Tumors finden sich zumindest 2 unterschiedlichen Zelltypen. Zwischen diesen Zellen besteht jedoch offensichtlich eine Reihe von Übergängen. Die Zellen des 1. Typs haben eine Größe von ca. 10-15 μ und häufig eine polygonale Gestalt. Sie haben einen relativ großen zentral liegenden runden bis ovalen Zellkern, der teilweise kleine Einbuchtungen der Kernmembran aufweist. Im Karyoplasma befinden sich relativ große Chromatinverdichtungen, aber nur wenig Euchromatin. An der inneren Kernmembran sind regelmäßige Chromatinverdichtungen lokalisiert.

Das Cytoplasma ist wenig elektronendicht. Es enthält nur wenig rauhes endoplasmatisches Retikulum, das in Form von kurzen Schläuchen im Cytoplasma verstreut liegt. Die vielen freien Ribosomen sind meistens zu Polysomen gruppiert. Die Mitochondrien sind vom Cristatyp. Zahlreiche Mitochondrien zeigen mehrere kleine Vakuolen, die eine beginnende Cristalyse darstellen können. Golgiapparate sind selten anzutreffen. Sie liegen dann in Kernnähe und haben nur wenige Cisternen und Vesikel. Weiterhin befinden sich einige primäre Lysosomen im Cytoplasma, darüber hinaus elektronendichte Granula von ca. 2000-4000 Å Durchmesser. Diese werden von einer Membran begrenzt. Zwischen dem homogen elektronendichten Inhalt und der sie umgebenden Membran zeigt sich meistens ein schmaler heller Spalt.¹⁾ Besonders häufig und konzentriert befinden sich diese Granula in Nähe der Zellmembran oder in plumpen Ausstülpungen.

Die Zellen des 2. Typs haben ebenfalls eine polygonale Gestalt. Die Zellmembran weist allerdings mehrere Einstülpungen und kurze plumpe Fortsätze auf. Der Zellkern ist gegenüber den

1) Ähnliche Granula, wenn auch kleiner, werden auch in sympathischen Nervenendigungen und in den Zellen des Nebennierenmarks beobachtet und dort als "dense core granula" bezeichnet (Hököfelt et al., 1972, Nashat und Merker, 1972).

Zellen des 1. Typs elektronendichter. Auch hier sind Chromatinverdichtungen anzutreffen. Die Kernmembran hat einen unruhigeren Verlauf. Der perinukleäre Raum ist an vielen Stellen deutlich erweitert und zeigt Verbindungen zum rauen endoplasmatischen Retikulum.

Auch das Cytoplasma ist gegenüber den Zellen des 1. Typs elektronendichter, was aber nicht allein mit dem vermehrten Vorkommen von Polysomen erklärt werden kann. Besonders auffällig ist die Zunahme von rauhem endoplasmatischem Retikulum. Diese Membransysteme sind überwiegend stark gebläht und enthalten teilweise feinfilamentäres Material. Die Mitochondrien, ebenfalls vom Cristatyp, sind größtenteils stark geschwollen und lassen nur noch selten gut erhaltene Cristastrukturen erkennen. In der Nähe des Zellkerns findet man mehrere gut ausgebildete Golgiapparate mit vielen Cisternen und Vesikeln. Regelmäßig werden im Cytoplasma auch einige Lysosomen und zahlreiche "dense core granula"-ähnliche Gebilde, die hier vermehrt gegenüber dem 1. Zelltyp zu sein scheinen, angetroffen.

Im Tumor kommen neben zahlreichen Mitosen, auch besonders verstärkt im Zentrum, Nekrosen vor, sodaß man nur in den Randgebieten des Tumors gut erhaltene Zellverbände findet. In den nekrotischen Arealen ist die Zellmembran häufig zerrissen, Zellorganellen sind in den extrazellulären Raum ausgetreten. Im rauen endoplasmatischen Retikulum vieler Zellen, besonders aber denen des 2. Typs, kommen 250-500 Å große elektronenoptisch dichte Partikel mit einer zentralen Aufhellung vor. Bei diesen Partikeln handelt es sich um Viren des RNS-Typs.

Der Tumor ist durch eine dicke bindegewebige Kapsel aus Fibroblasten mit gut entwickeltem endoplasmatischem Retikulum und großen Mengen von Fibrillen im extrazellulären Raum gegenüber der Umgebung gut abgegrenzt. Hier finden sich vereinzelt auch Kapillaren. Da, wo die Zellen etwas lockerer gepackt sind, und damit weite Interzellularräume bestehen, existieren zahl-

reiche tangentielle Anschnitte durch ca. 1-3 μ große Fortsätze, die neben Mitochondrien, ganz vereinzelt hellen Vesikeln, vor allem "dense-core-granula"-ähnliche Gebilde aufweisen.

Deckglas-, Organ- und Monolayerkultur

Während des Neuroblastomwachstums kommt es unter den verschiedenen Kultivationsbedingungen zu charakteristischen morphologischen Zellveränderungen gegenüber dem in vivo Tumor. Diese Veränderungen treten sowohl in der Deckglas- und Organkultur als auch in der Monolayerkultur in ähnlicher Form auf, sodaß sie gemeinsam beschrieben werden können. Diese Veränderungen sind eine Hypertrophie und Vakuolisierung des Nukleolus, Einbuchtungen der Kernmembran und Einschlüsse im Zellkern, Auftreten von Filamenten und Tubuli im Cytoplasma, Ausstülpungen und Fortsatzbildung an der Zellmembran. Daneben kommen aber auch wie in den in vivo Tumoren Viren in vielen Zellen vor.

Ebenfalls wie in dem in vivo Tumor herrscht ein polygonaler Zelltyp vor. Allerdings lassen sich die 2 Zelltypen hier nur ungenau abgrenzen. Der Zellkern zeigt häufig stärkere Einbuchtungen der Kernmembran. Das Chromatin erscheint relativ homogen, ein Teil ist randständig gelagert und verdichtet. Auffällig ist der große häufig vakuolisierte Nukleolus mit deutlich erkennbaren Nukleonemata und der Pars amorphia.

In den Kernen vieler Zellen aller drei Kulturen finden sich Cytoplasmaeinstülpungen, die gegenüber dem übrigen Cytoplasma verstärkt Organellen wie Mitochondrien, Polysomen und rauhes endoplasmatisches Retikulum enthalten, oder aber in denen vermehrt Mikrofilamente in paralleler dichter Lagerung vorkommen. Diese Einstülpungen haben zum Teil noch Kontakt zum Cytoplasma, oder aber sie sind bereits abgeschnürt und befinden sich damit isoliert im Kern. Während die nukleären Einstülpungen, die noch Kontakt zum Cytoplasma haben, dichte Chromatinanlagerungen entlang der sie umgebenden Kernmembran aufweisen, sind die isolierten echten Inklusionen frei von Chromatinanlagerungen.

Bei einigen der echten Inklusionen kommt es sogar zur Auflösung

der sie umgebenden Membranen und infolgedessen zum Austreten von Zellorganellen ins Karyoplasma. Dadurch enthalten viele Kerne neben Membranfragmenten in spiraliger Anordnung, Ansammlungen von Mitochondrien, Lysosomen und Golgiapparaten. (Abb. 6-12)

Das Cytoplasma erscheint mäßig elektronendicht, enthält viele Polysomen, sowie in unterschiedlichem Ausmaß Profile des rauhen endoplasmatischen Retikulums. In einigen Zellen sind die endoplasmatischen Hohlräume gebläht und mit feinfilamentärem Material angefüllt, andere Zellen weisen aber auch einen versikulären Zerfall des rauhen endoplasmatischen Retikulums auf. Weiterhin finden sich Mitochondrien vom Cristatyp - häufig mit ausgeprägten Zeichen einer Cristalyse - und vereinzelt Golgiapparate in Kernnähe. Im Cytoplasma vieler Zellen sieht man filamentäre und tubuläre Strukturen meist in paralleler Anordnung, die sich, wie bereits oben beschrieben, vorwiegend in Kerneinstülpungen hineinziehen. Wie in dem in vivo Tumor existieren im Cytoplasma 2000Å - 4000Å unterschiedlich große "dense core granula"-ähnliche Gebilde, die oft zu mehreren gruppiert in der Nähe der Zellmembran bzw. in plumpen fortsatzähnlichen Ausstülpungen anzutreffen sind.

In allen Kulturen treten Fortsätze von variabler Form auf. Sie sind in der Monolayer-Kultur besonders zahlreich und weisen dort mit mehreren hundert Mikron auch die größte Ausdehnung auf. In der organoiden Kultur liegen sie vorwiegend in der Randzone, wo ein Auswachsen, unbehindert durch zu große Zelldichte, relativ frei erfolgen kann. Diese Fortsätze stellen sich jedoch, da ein paralleler Schnittverlauf nur selten gelingt, meistens plump und stummelförmig dar. Fast alle Fortsätze enthalten, zum Teil entlang ihrer ganzen Ausdehnung, vornehmlich jedoch an ihrem etwas aufgetriebenen Ende, "dense core granula" - ähnliche Gebilde von verschiedener Größe (2000 Å bis 4000 Å). Daneben kommen vereinzelt Mitochondrien, Filamente, aber auch Ribosomen, jedoch keine größeren Ansammlungen von Mikrotubuli vor.

Ganz vereinzelt werden in den Organkulturen Bezirke angetroffen, wo zwischen den Perikarya der Zellen eng verschlungene Fortsätze auftreten. Diese Areale erinnern an das Neuropil, wie es im ZNS beobachtet wird (Abb.16). In der Kultur werden darüber hinaus Zellen gesehen, von denen in paralleler Anordnung ca. 750 Å - 3000 Å dicke Cytoplasmalamellen ausgehen. Diese Zellen weisen damit Ähnlichkeiten zu Oligodendroglia-Zellen auf (Abb.17). In der vom Medium abgewandten Randzone, die in die Gasphase hineinragt, treten bei den Organkulturen größere Nekroseareale auf. Sie sind durch Zelldetritus mit gerissener Zellmembran, in den extrazellulären Raum ausströmende Zellorganellen und Kernauflösung gekennzeichnet. Zahlreiche Fortsätze, die inmitten dieser Zone gefunden werden, zeigen demgegenüber eine relativ gut erhaltene Struktur. Sie dürften damit besser ernährten, tiefer gelegenen Zonen entspringen.

Wie in dem in vivo Tumor enthalten viele Zellen vereinzelt Viren in vesikulären Abschnürungen. Andere hingegen zeigen eine typische plaques-artige Anordnung von dichtgepackten Viren in Nähe des Zellkerns. Auch hier liegen die Viren auf der Oberfläche und in den Hohlräumen des rauen endoplasmatischen Retikulums. Besonders in den Zellen, die eine solche plaques-artige Anordnung von Viren aufweisen, sehen wir häufig stark hypertrophierte und vakuolisierte Nukleoli. (Abb.13,5)

In manchen Zellen sieht man im Cytoplasma in Nähe des Zellkerns wabige, anscheinend kristalline Strukturen in einer Ausdehnung von ca. 5 µ (Abb 14). In diesem Bereich fehlen die üblichen Cytoplasmastrukturen. Die diesen Bezirk umgebenden Mitochondrien sind stark geschwollen und weisen kaum noch Cristastrukturen auf, bei einigen sind auch die äußeren Membransysteme nicht mehr deutlich zu erkennen oder die innere Membran fehlt.

Diskussion

Sowohl in vivo als auch unter verschiedensten Kulturbedingungen weisen die Zellen des Tumorgewebes Differenzierungsmerkmale von Nervenzellen auf. Besonders in bezug auf Struktur und Form des Cytoplasmas zeigen sich viele Ähnlichkeiten mit Sympathikus- bzw. Nebennierenmarkzellen (Hökfelt, 1968; Nashat und Merker, 1972). Typisch für Nervenzellen sind das Vorkommen von rauhem endoplasmatischem Retikulum und zahlreichen Mitochondrien im Cytoplasma, die Ausbildung von Fortsätzen mit Mikrotubuli und Filamenten, das Vorkommen Transmitter-speichernder Granula und umschriebene Kontakte in Form von Synapsen zur Weiterleitung elektrischer Impulse.

In vivo und unter Kulturbedingungen entwickeln sich zahlreiche dieser Merkmale. Längere Fortsätze mit kolbigen Auftreibungen treten jedoch nur in der Monolayer-Kultur auf, wo entsprechende Bedingungen für ein unbehindertes Wachstum existieren. Aber auch in vivo und in den Randbezirken der Organkulturen finden sich häufig Anschnitte durch Fortsätze. In einigen biochemischen und fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte der Nachweis von Transmittern nur im in vitro-Tumorgewebe erbracht werden (Augusti-Tocco et al., 1969; Hermetet et al., 1972). Amano et al. (1971) zeigten die Existenz der Tyrosin-Hydroxylase und Cholin-Acetyl-Transferase, wichtiger Enzyme für die Synthese von Adrenalin und Acetylcholin. Damit scheint biochemisch das Vorkommen von adrenergen und cholinergen Neuronen gesichert.

Wir fanden sowohl im Cytoplasma, besonders aber entlang der Fortsätze, zahlreiche elektronendichte Granula, wie sie als "dense core granula" in Monoamin-haltigen Neuronen bekannt sind. Zahlreiche dieser Granula weisen jedoch Größen bis zu 4000 Å auf und sind damit erheblich größer als die typischen "dense core granula" von Nervenendigungen, die nur eine Größe von 600 bis 800 Å haben. Außerdem erscheint die helle Zone zwischen Vesikelmembran und Herz (core) verschmälert.

Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits von Schubert et al. (1969) gemacht. Es muß also diskutiert werden, ob zahlreiche Granula einen qualitativ unterschiedlichen Gehalt aufweisen und damit eine andere Funktion haben, oder ob es durch verminderte bzw. fehlende Ausschüttung zu einem Sekretstau und möglicherweise zum Zusammenfließen einiger Granula kommt. Optisch leere Vesikel, wie sie bei Acetylcholin-haltigen Neuronen bekannt sind (Kelly und Zacks, 1969) kommen nur selten vor.

Synapsenähnliche Kontakte oder gar Synapsen zwischen einzelnen Fortsätzen und Perikarya konnten wir an keiner Stelle mit Sicherheit beobachten. Die Frage, was die Synapsenbildung bewirkt, bzw. warum sie im Tumor unterbleibt, könnte nur spekulativ beantwortet werden. Bekannt ist jedoch, daß sich nach Stimulierung Aktionspotentiale an Fortsätzen ableiten lassen. (Nelson et al., 1969). Es müssen also neben der Fähigkeit zur Erregbarkeit der Membran sicher noch andere entscheidende Faktoren bei der Synapsenentstehung in vitro eine Rolle spielen.

Das Vorkommen morphologisch unterschiedlicher Zellen, wie "Oligodendroglia-ähnlicher" Zellen und Zellen mit "Dendriten-ähnlichen" Fortsätzen sowie Zellen, bei denen es zu einer Neuropilähnlichen Lagerung zahlreicher Fortsätze kommt, läßt die Frage nach der Herkunft des Tumors und damit nach seiner bzw. seinen Stammzellen entstehen. Es wäre zu klären, ob es sich a) bei den Zellen um einen unterschiedlichen Differenzierungsgrad der gleichen Zelle oder b) um Zellen mit unterschiedlicher genetischer Potenz handelt.

Mit morphologischen Mitteln allein ist dieses Problem jedoch nicht zu lösen. Biochemisch ergibt sich durch das Nebeneinander von adrenergen, cholinergen und keine Transmitter produzierenden Neuronen (Augusti-Tocco et al., 1969; Amano et al., 1972) ein Hinweis, daß es eine Ursprungszelle des Tumors geben muß, die,

wie die Zellen der primitiven Neuralleiste, eine breite prospektive Potenz beinhaltet.

In zahlreichen Zellen des Tumorgewebes werden auf der Oberfläche und in den Hohlräumen des rauen endoplasmatischen Retikulums elektronendichte Partikel mit einer zentralen Aufhellung von ca. 250 bis 500 Å Durchmesser dargestellt, die mit großer Wahrscheinlichkeit als Viren vom RNS-Typ bezeichnet werden können. Daraus ergeben sich zwei Fragen:

1. Sind die Viren ursächlich für die Tumorgenese verantwortlich?
2. Haben Sie einen modifizierenden bzw. sogar transformierenden Einfluß auf die Zellen?

Die Aussagen in bezug auf die Virusgenese des Tumors sind in der Literatur widersprüchlich. Während Prasad et al. (1970) mit einem zellfreien Extrakt von Tumorgewebe neue Tumoren erzeugten, konnten Myers et al. (1971) diese Ergebnisse in Serienversuchen an jungen Mäusen nicht reproduzieren. Es ist also wahrscheinlich, daß es sich hierbei lediglich um einen sekundären Virusbefall handelt, wie er häufiger bei Tumoren an Mäusen beobachtet wird (Klima 1967). Damit gewinnt die Möglichkeit, daß es allein durch diese Viren zu Zelltransformationen kommt, nur geringe Wahrscheinlichkeit.

Auffällig ist jedoch ein gewisser Unterschied in der Art des Virusbefalls bei in vivo und in vitro Tumoren und ein daraus resultierendes unterschiedliches Zellbild im Tumor. Die Viren kommen in den Zellkulturen im Vergleich zu den in vivo Tumoren mindestens ebenso häufig, in vielen Zellen aber sogar stark vermehrt vor. Damit ist klar, daß sich die Viren in der Zellkultur ebenso schnell oder schneller vermehren als die Zellen selbst. Klima (1967) vermutete, daß eine verstärkte Mitoserate in den Zellkulturen, wie sie auch bei uns in manchen Arealen gesehen wird, die Virusvermehrung begünstigt. Auf jeden Fall müssen die Zellen in der Lage sein, kompensatorisch vermehrt RNS und Proteine zu produzieren, um einerseits den zelleigenen

Bedarf, andererseits aber auch das für die Viren notwendige Material bereitzustellen. In den Zellkulturen herrscht eine starke Stoffwechselaktivität, was am schnellen Verbrauch des Kultivationsmediums sichtbar wird. Stark hypertrophierte und vakuolisierte Nukleoli, wie wir sie in vielen Zellen gefunden haben, sprechen für eine vermehrte Synthese an ribosomaler RNS. Sie sind u.a. auch bei Befall der Zellen mit RNS-Viren beschrieben worden (David, 1964). Das vermehrte Vorkommen von Polysomen paßt als Zeichen einer gesteigerten Proteinsynthese ebenfalls gut zu diesem Verhalten. Wann und ob es überhaupt zu einer Erschöpfung des Stoffwechsels in den Zellen kommt, kann mit morphologischen Mitteln nicht beurteilt werden.

Möglicherweise handelt es sich bei der Auskristallisation von cytoplasmatischem Material, der Auflösung cytoplasmatischer Membranen und dem Auftreten stark geschwollener Mitochondrien um einen beginnenden cytopathogenen Effekt (CPE), wie man ihn beim Befall der Zellen mit pathogenen Viren kennt.

Auffallend sind die Kernveränderungen, wie sie in den Kulturen auftreten. Cytoplasmatische Einstülpungen in den Kern hinein werden abgeschnürt, sodaß sie vollständig im Karyoplasma zu liegen kommen. Dort werden ihre Membranen aufgelöst und es kommt zum Ausstrom von Organellen ins Karyoplasma. Ähnliche Kerneinschlüsse cytoplasmatischen Materials wurden als Pseudoinklusiven (solange noch ein Kontakt zum Cytoplasma besteht) und auch selten als echte Inklusionen bereits unter verschiedensten Bedingungen beobachtet. Sie kommen bei Tumoren vor (Ashworth et al., 1960; Theron et al., 1962; Welsh et al., 1964), nach Virusinfektionen (Vetterlein et al., 1965; Godman 1966) und in alten Zellen (Andrew, 1962).

Bei uns handelt es sich also nach dieser Definition anfänglich um Pseudoinklusiven, die nach Abschnürung vom Cytoplasma zu echten Inklusionen werden und deren Material schließlich aufgelöst wird. Dieser Vorgang wurde schon 1964 von David

hypothetisch diskutiert. Diese Kerneinschlüsse entstehen bei uns aber ganz sicher nicht, wie von Brandes et al. (1965) vermutet, durch eine abnorme Mitose. Auch ist das Vorkommen von Membranen im Karyoplasma bei uns nicht auf eine abnorme Synthese dieses Materials durch die Innere Kernmembran zurückzuführen, wie Bucciarelli (1966) es beim Auftreten von Golgiapparat-ähnlichen Strukturen im Karyoplasma tat.

Zur Entstehung solcher schlauchähnlicher Einstülpungen (Pseudoinklusionen) in an sich nicht stark zerklüftete Zellkerne ist, sofern das Kernvolumen erhalten bleibt, eine Vermehrung von Kernmembranmaterial unbedingte Voraussetzung. Sobel (1969) vermutete eine Volumenzunahme des Cytoplasmas als Ursache für die Entstehung von Pseudoinklusionen, die er in stark zerklüfteten Zellkernen fand. Dieses erscheint uns nicht wahrscheinlich, da sich ein durch Volumenzunahme erhöhter intrazellulärer Druck gleichmäßig auf alle Teile des Kerns auswirken muß.

Diese Kerneinschlüsse weisen darüber hinaus häufig Ähnlichkeiten zu neuronalen Fortsätzen auf. Sie zeigen vermehrt Mikrotubuli und Filamente in dichter paralleler Anordnung und neben ganz vereinzelt Polysomen nur noch Mitochondrien und Granula. Dies könnte als Ausdruck einer verstärkten Differenzierung in den Inklusionen angesehen werden. Daraus ergäbe sich ein Differenzierungsanstieg in bezug auf die neuronalen Strukturelemente in den einzelnen Zellen, das folgende Sequenz aufweist: Peripheres Cytoplasma, Cytoplasma in Kernnähe, Pseudoinklusion, Inklusion (Abb. 6-11).

Ursächliche Erklärung dieser zunehmenden Differenzierung könnte sein:

1. Substratmangel im Cytoplasma der Kerninklusionen. Es ist bekannt, daß man eine Differenzierung der Zellen mit Ausbildung von Fortsätzen mit Mikrotubuli und Filamenten in vitro durch den Entzug von Serum im Nährmedium erreichen

kann (Seeds et al., 1970)

2. Spezifische Substratbildung (Induktor) vom Karyoplasma. Dieser " Induktor " hätte im Cytoplasma in Nähe der Kernmembran, wenn man eine Diffusion als Verteilungsvorgang annimmt, die höchste Konzentration. Besonders stark aber wird dieser Induktor in den Inklusionen angereichert sein, da diese vollständig vom Karyoplasma umschlossen sind und so kein eigentliches Diffusionsgefälle entstehen kann. Zur Differenzierung der Zellen könnte demnach nicht nur ein " exogener " Induktor führen, der dem Nährmedium zugefügt werden muß wie z. B. Dibutyryl-Adenosin-3'-5'-cyklisches-Monophosphat (Prasad et al., 1971; Furmanski et al., 1971) oder 5-Bromodeoxyuridin (Schubert et al., 1970), sondern auch ein " endogener " Induktor, der im Karyoplasma gebildet wird und per Diffusion durch die Kernmembran in das Cytoplasma und die Inklusionen gelangt.

Für diese Hypothese spricht der Befund, daß Mikrofilamente und Tubuli außer in Inklusionen und Fortsätzen nur in Kernnähe lokalisiert sind, im restlichen Cytoplasma aber fehlen.

Zusammenfassung

Das Mäuseneuroblastom C 1300 wurde elektronenmikroskopisch in vivo und in vitro als Deckglas-, Organ- und Monolayer-Kultur untersucht. In vivo fanden sich im Tumor zwei deutlich zu unterscheidende Zelltypen. Sowohl in vivo als auch in vitro werden Viren vom RNS-Typ auf der Oberfläche und in den Hohlräumen des rauen endoplasmatischen Retikulums nachgewiesen. Sie kommen in den Zellkulturen häufig vor und haben eine plaques-artige Anordnung. In den Zellen mit starkem Virusbefall finden sich stark hypertrophierte Nukleoli.

In einigen Zellen des in vivo Tumors bilden sich kurze plumpe Fortsätze, die viele "dense core granula"-ähnliche Gebilde und Mitochondrien, aber keine Mikrotubuli und Filamente enthalten. Geeignete Nährbedingungen führen in den Zellkulturen zu einer verstärkten Differenzierung mit der Ausbildung von Neuriten-ähnlichen Fortsätzen, in denen Mikrotubuli, Filamente, "dense core granula"-ähnliche Gebilde und Mitochondrien auftreten.

Außer Neuronen-ähnlichen Zellen finden sich in der Organkultur Oligodendroglia-ähnliche Zellen, die zahlreiche dünne Lamellen ausbilden. An anderer Stelle der Organkultur konnten wir eine enge Verschlingung von Fortsätzen beobachten, die an das Neuropil des ZNS erinnert.

In allen Kulturen treten auffallende Kernveränderungen auf. Cytoplasmatische Einstülpungen werden abgeschnürt, sodaß sie vollständig im Karyoplasma zu liegen kommen. Dort werden ihre Membranen aufgelöst und es kommt zum Ausstrom von Organellen und anschließend zur lysosomalen Veränderung dieses cytoplasmatischen Materials.

In allen Inklusionen ist anfänglich eine Vermehrung der cytoplasmatischen Organellen, sowie eine verstärkte Differenzierung des eingeschlossenen Materials nachzuweisen. Mikrotubuli und

Filamente kommen in den Fortsätzen, vermehrt in den Pseudo-
inklusionen und Inklusionen, im übrigen Cytoplasma jedoch nur
in Kernnähe, vor.

Literatur

- Amano, T., E. Richelson and M. Nierenberg: Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 258-263 (1972)
- Andrew, W.: An electron microscopic study of age changes in the liver of the mouse. Amer. J. Anat. 110, 1-18 (1962)
- Augusti-Tocco, G. and G. Sato: Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. Proceedings Nat. Acad. Sci. USA 64, 311-315 (1969)
- Floom, G.D.: A nucleus with cytoplasmatic features J. Cell Biol. 35, 266-268 (1967)
- Blume, A., F. Gilbert, S. Wilson, J. Farber, R. Rosenberg and M. Nierenberg: Regulation of acetylcholinesterase in neuroblastoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 67, 768-792 (1970)
- Brandes, D., B. Schofield and E. Anton: Nuclear mitochondria. Science 149, 1373 (1965)
- Bucciarelli, E.: Intranuclear cisternal resembling structures of the Golgi-complex. J. Cell Biol. 30, 664-669 (1966)
- David, H.: Physiologische und pathologische Modifikationen der submikroskopischen Kernstruktur. Z. mikr.-anat. Forsch. 71,
I. Das Karyoplasma, Kerneinschlüsse. 71, 412-456 (1964)
II. Die Kernmembran. 71, 526-550 (1964)
III. Der Nukleolus. 71, 551-586 (1964)
- Dunham, L.C. und H.L. Stewart: A survey of transplantable and transmissible animal tumors. 13, 1299 (1953)

Elliot, K.A.C., I.H. Page und J.M. Quastel (Herausg.):
Neurochemistry, Thomas, Springfield, Illin., (1965)

Furmanski, P., D.J. Silvermann und M. Lubin: Expression of
differentiated functions in mouse neuroblastoma mediated
by dibutyl-cyclic adenosine monophosphate. Nature (Lond)
233, 413-415 (1971)

Godman, G.L.: The cytopathology of enteroviral infection.
Internat. Rev. exp. Path. 5, 67-110 (1966)

Goldstein, M.N. and D. Pinkel: Long-term tissue culture of
neuroblastomas. J. Natl. Canc. Inst. 20, 675-689 (1958)

Goldstein, M.N., J.A. Burdman and L.J. Journey: Long term tissue
culture of neuroblastomas. J. Natl. Canc. Inst. 32,
165-199 (1964)

Hermetet, J.C., J. Ciesielski-Treska and P. Mandel: Cyto-
chemical demonstration of catecholamines and acetyl-
cholinesterase activity in neuroblastoma cells in culture.
J. Histochem. Cytochem. 20, 137-138 (1972)

Hökfelt, T.: In vitro studies on central and peripheral monoamine
neurons at the ultrastructural level. Z. Zellforsch. 91,
1-74 (1968)

Kelly, A.M. and S.I. Zacks: The fine structure of motor endplate
morphogenesis. J. Cell Biol. 42, 154-169 (1969)

Klima, J.: Cytologie c.G. Fischer Verlag Stuttgart (1967)

De Lellies, R.A., A.S. Rabson, D. Albert: The cytochemical
distribution of catecholamines in the C 1300 murine neuro-
blastoma. J. Histochem. Cytochem. 18, 913 (1970)

- Lumsden, C.E.: In: The structure and function of nervous tissue. Ed. Bourne, Vol. I, New York Acad. Press, 67-138 (1968)
- Moscona, A., A.O. Trowell and E.N. Willmer: Methods. In: Cells and tissues in Culture. Vol. I, 19, London-New York: Acad. Press (1965)
- Myers, D.D., H. Meier, R.J. Huebner and J. Walker: Cell-free transmission of mouse neuroblastoma. Nature (London) 234, 100 (1971)
- Nashat, B. und H.J. Merker: Das elektronenmikroskopische Bild der Nebennieren vor und nach der Geburt bei Maus und Ratte. In: Perinatale Medizin, Bd. III, Thieme-Verlag Stuttgart, Hrsg. Saling, E. und Dudenhausen, J. W., 572-578 (1972)
- Nelson, P., W. Ruffner and M. Nierenberg: Neuronal tumor cells with excitable membranes grown in vitro. Proceedings Nat. Acad. Sci. USA 64, 1004-1010 (1969)
- Olmsted, J.B., G.B. Witman, K. Carlson and J.L. Rosenbaum: Comparison of the microtubule proteins of neuroblastoma cells, brain and Chlamydomonas Flagella. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 68, 2273-2277 (1971)
- Prasad, K.N., J. Zamberland, R. Lasher and M. H. Van Woert: Transmission of mouse neuroblastoma by a cell-free extract. Nature 228, 997 (1970)
- Prasad, K.N.: X-ray induced morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells in vitro. Nature (Lond) 234, 471- 3 (1971)
- Prasad, K.N., and A.W. Hsie: Morphological differentiation of mouse neuroblastoma cells induced in vitro by dibutyryl adenosine 3'-5'-cyclic monophosphate. Nature (New Biol) 233, 141- 2 (1971)

- Schubert, D., S. Humphreys, C. Baroni and M. Cohn: In vitro differentiation of a mouse neuroblastoma. Proceedings Nat. Sci. USA 64, 316 (1969)
- Schubert, D. und F. Jakob: 5-Bromodeoxyuridine induced differentiation of a neuroblastoma Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 247-254, (1970)
- Schubert, D., H. Tarikas, A. Harris, S. Heinemann: Introduction of acetylcholine esterase activity in a mouse neuroblastoma. Nature (New Biol) 233, 79-80 (1971)
- Seeds, N.W., A.G. Gilman, T. Amano und M. Nierenberg: Regulation of axon formation by clonal lines of a neural tumor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 66, 160-167 (1970)
- Stewart, H.L., K.C. Snell und L.C. Dunham: An Atlas of Tumor Pathology (Armed Forces Institute of Pathology) sect. XII, fascicle 40 (1959)
- Sobel, H.J., R. Schwarz und E. Marquet: Non viral nuclear inclusions. 1. Cytoplasmatic invaginations. Arch. Pathol. 87, 179-192 (1969)
- Trowell, O.A.: The culture of mature organs in a synthetic medium. Exp. Cell Res. 16, 118-147 (1959)
- Theron, J.J., W. J. Pepler und N. Liebenberg: The fine cytology of human malignant hepatoma cells, Vth intern. Congr. f. Electron Microscopy, Philadelphia, Vol. II, pp-4 (1962)
- Vetterlein, W. und R. Hesse: Die Virushepatitis des Menschen und der Maus im elektronenmikroskopischen Bild. Arch. exp. Vet.-Med. 19, 231-240 (1965)
- Welsh, R.A. und A.T. Meyer: A histogenetic study of chondroblastoma. Cancer 17, 578-588 (1964)

Zimmermann, B.: Persönliche Mitteilung (1972)

Abb. 1: 1. Zelltyp des in vivo Tumors*. Große helle Zelle (Z) mit polygonaler Gestalt, Ü Zellen, die als Übergang zwischen 1. und 2. Zelltyp betrachtet werden können. M Mitochondrien vom Cristatyp, die mehrere kleine Vakuolen aufweisen, (↗) Profile des rauhen endoplasmatischen Retikulums in Form von kurzen Schläuchen. 1:17000

* Bei sämtlichen Abbildungen handelt es sich um elektronenmikroskopische Aufnahmen des Mäuse-neuroblastoms C 1300.

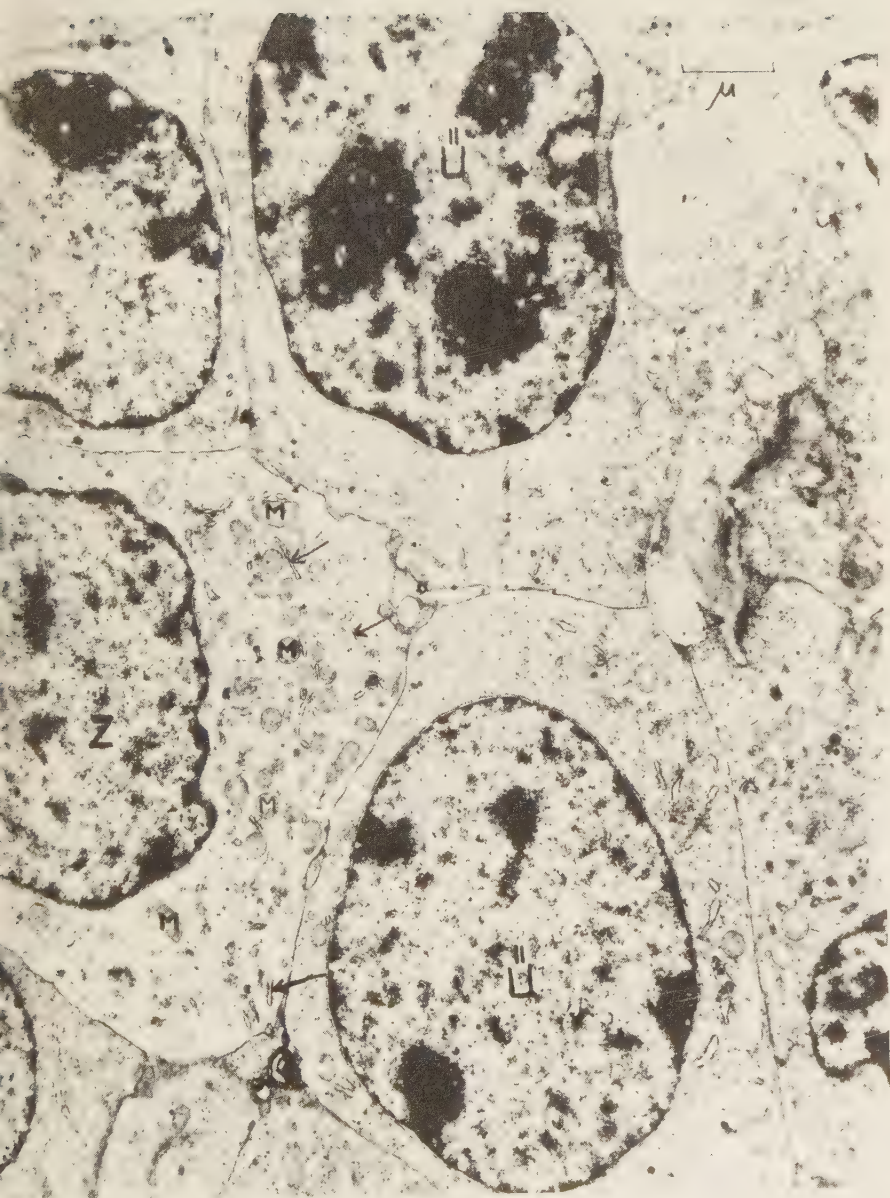


Abb. 2: 2. Zelltyp des in vivo Tumors mit stark elektronen-
dichtem Cytoplasma. Die Kernmembran weist größere Un-
regelmäßigkeiten (X) auf. Der perinukleäre Raum ist
an einigen Stellen deutlich erweitert (|) und zeigt
Verbindungen zum rauhen endoplasmatischen Retikulum
(eR). Dieses ist überwiegend stark gebläht und ent-
hält zahlreiche Viruspartikel (↑). G Golgiapparat,
M Mitochondrien mit Zeichen der Schwellung und
Cristalyse, N Zellkern, "dense core granula"-ähnliche
Gebilde (↓). 1:28000

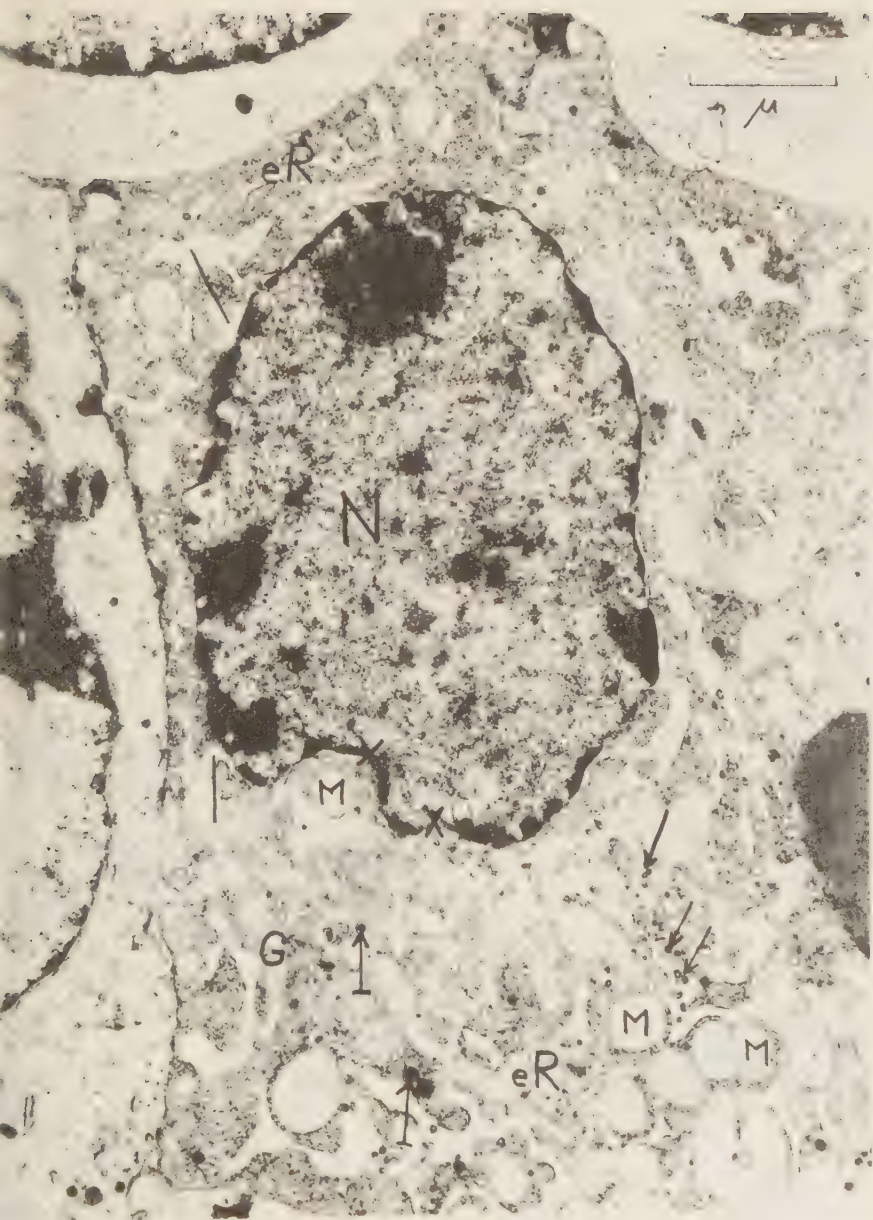


Abb. 3: Fortsatz aus dem in vivo Tumor mit vielen
"dense core granula"ähnlichen Gebilden (↑)
zwischen kollagenen Fibrillen (K) und
Tumorzellen (Z). 1:24000

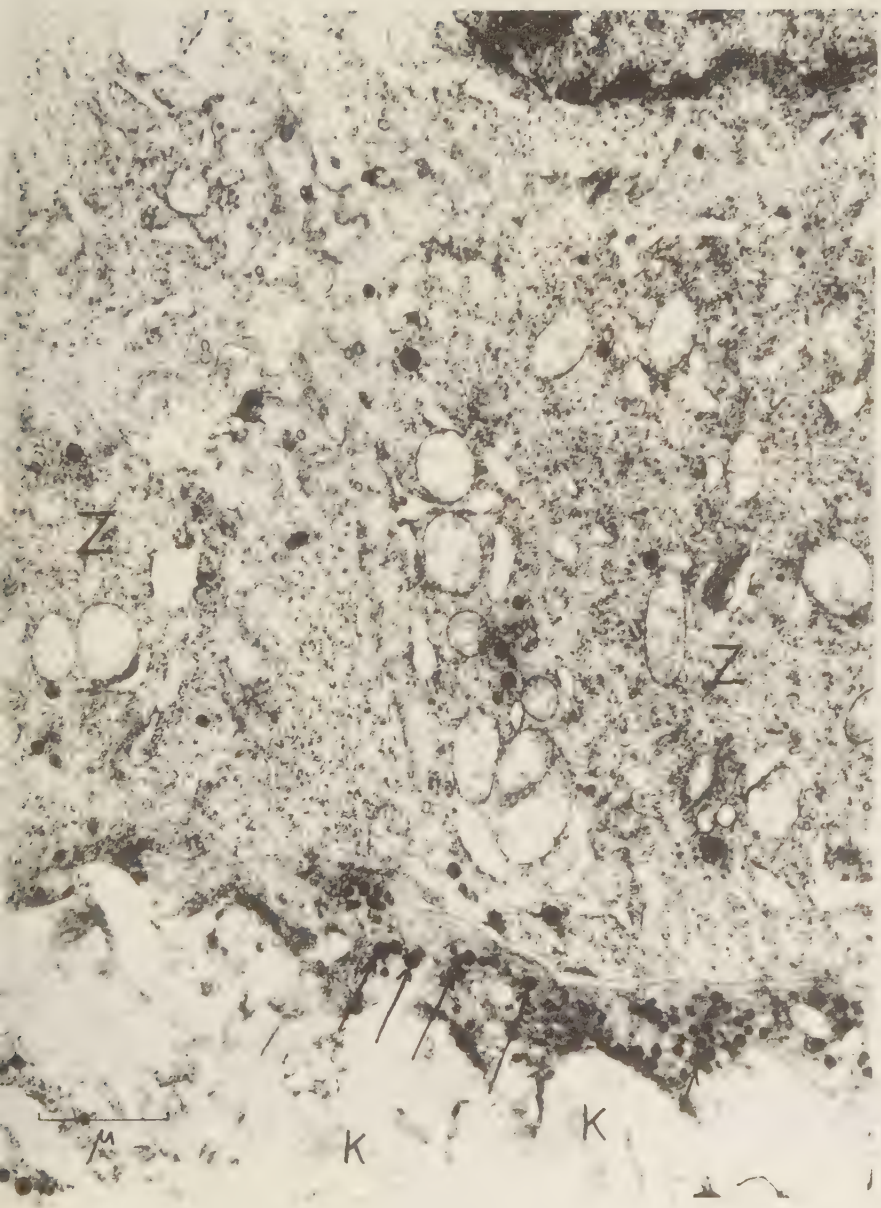


Abb. 4: Quergeschnittener Fortsatz aus dem in vivo Tumor mit zahlreichen "dense core granula"-ähnlichen Gebilden (↑) und medial einem Mitochondrium (M_F) in einer Zelle des 1. Typs. M geschwollene Mitochondrien, N Zellkern, eR schlauchähnliche Profile des rauhen endoplasmatischen Retikulums, E Erythrozyt. 1:35000

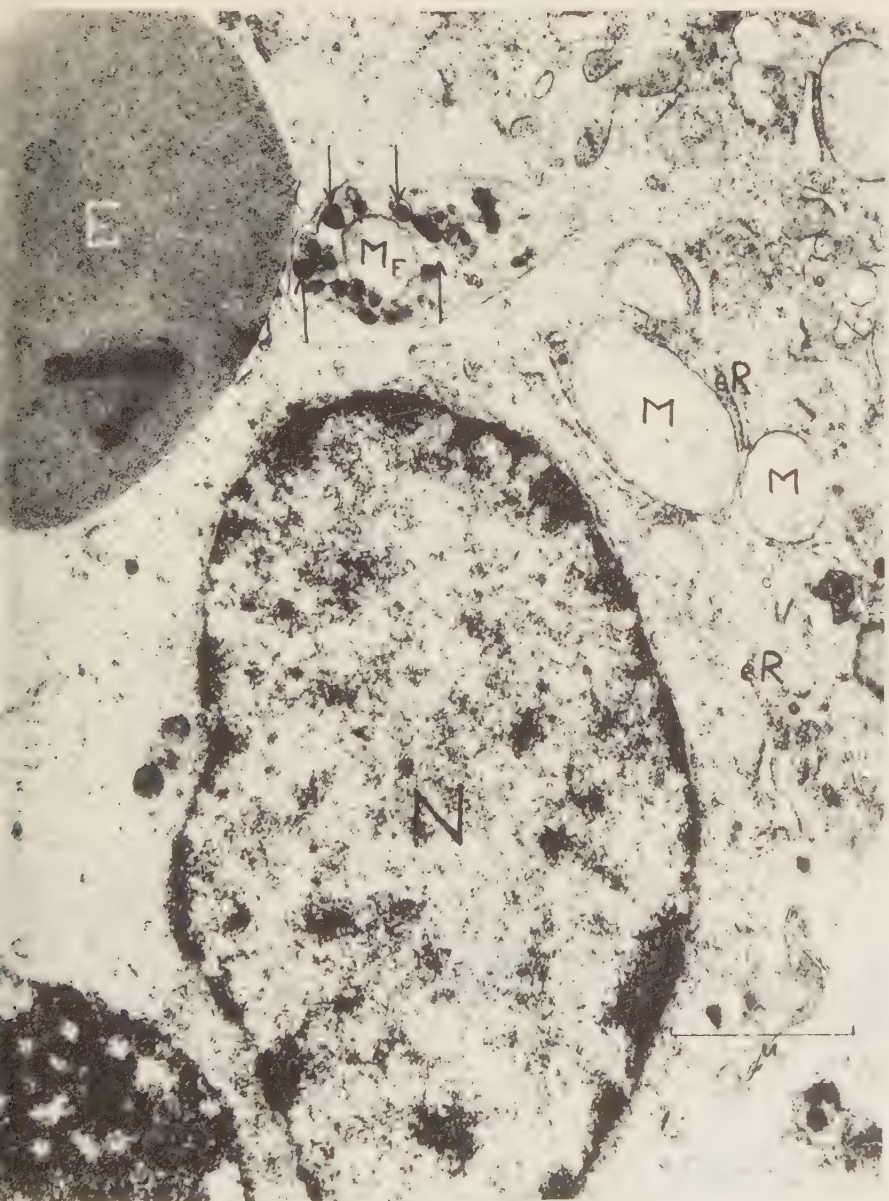


Abb. 5: Zellen aus der Organkultur nach 5 Tagen Kultivation. Auffällig sind die stark hypertrophierten und teilweise vakuolisierten Nukleoli (No) mit der Pars amorpha (x) und Nukleonemata, (↗) Pseudoinklusionen, (↓) Membraneinfältelungen. In Nähe des Zellkerns vereinzelt Mikrofilamente (|). 1:19000

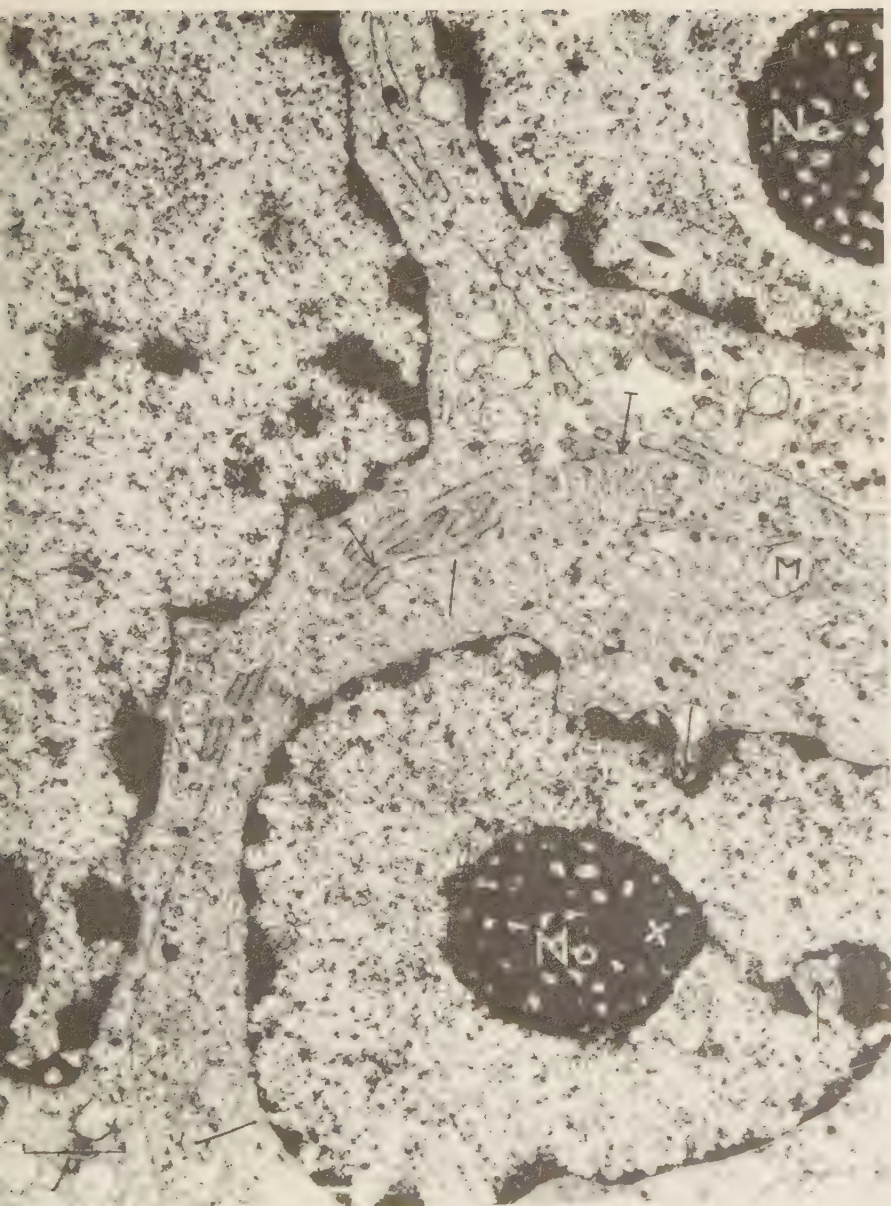


Abb. 6: Zelle aus der Monolayer-Kultur nach 2 Tagen
Kultivation. Tiefe Einbuchtung der Kernmembran (X).
In diesem Bereich zahlreiche feine Mikrofilamente ($\nearrow$),
elektronendichte Granula ($\Downarrow$), Mitochondrien (M) mit
Zeichen der Matrixschwellung und Cristalyse, ver-
einzelten Lysosomen (L). 1:19000

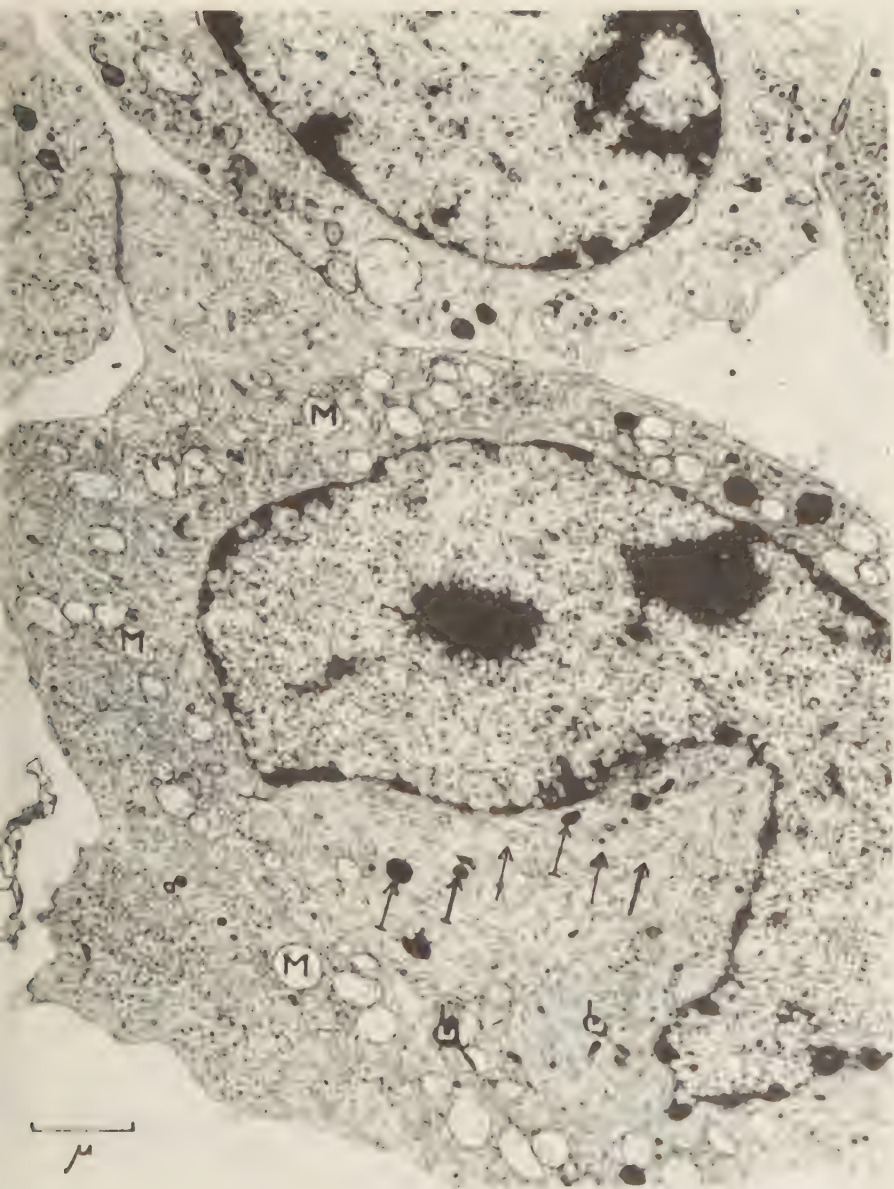


Abb. 7: Zelle aus der Monolayer-Kultur nach 2 Tagen Kultivation. Zellkern mit Pseudoinkclusionen (P), die von randständig gelagertem Chromatin (C) umgeben sind und zahlreiche parallel liegende Mikrotubuli (↑) beinhalten. Hypertrophierter Nukleolus (No), teilweise vakuolisiert. 1:28000

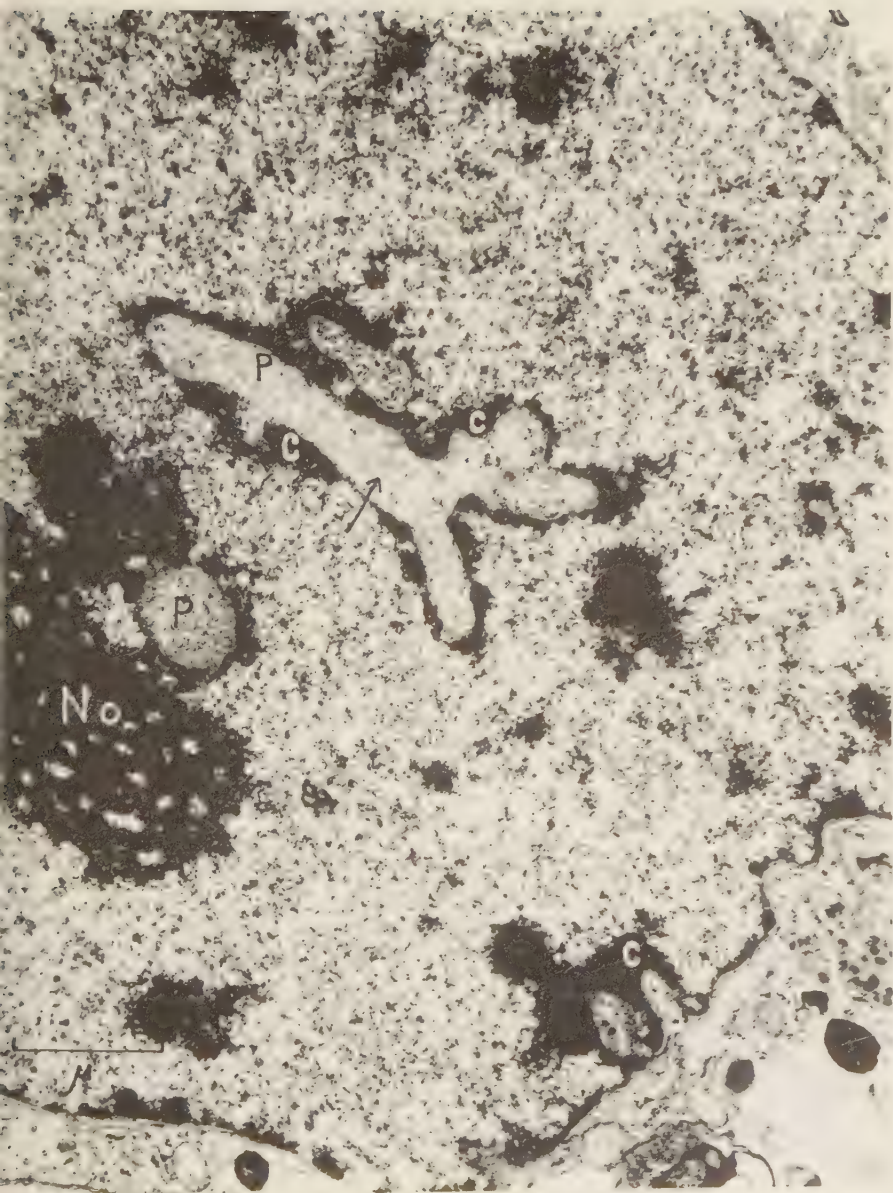


Abb. 8: Zelle aus der Monolayer-Kultur nach 2 Tagen Kultivation. Zellkern mit Inklusion (I), die viele gut entwickelte Mikrotubuli und Filamente (f) enthält und nicht mehr von randständig gelagertem Chromatin umgeben ist. Auch in Kernnähe feine Filamente. Mitochondrien (M) mit Zeichen der Schwellung und Cristalyse, Lysosomen (L), Nukleolus (No). 1:28000

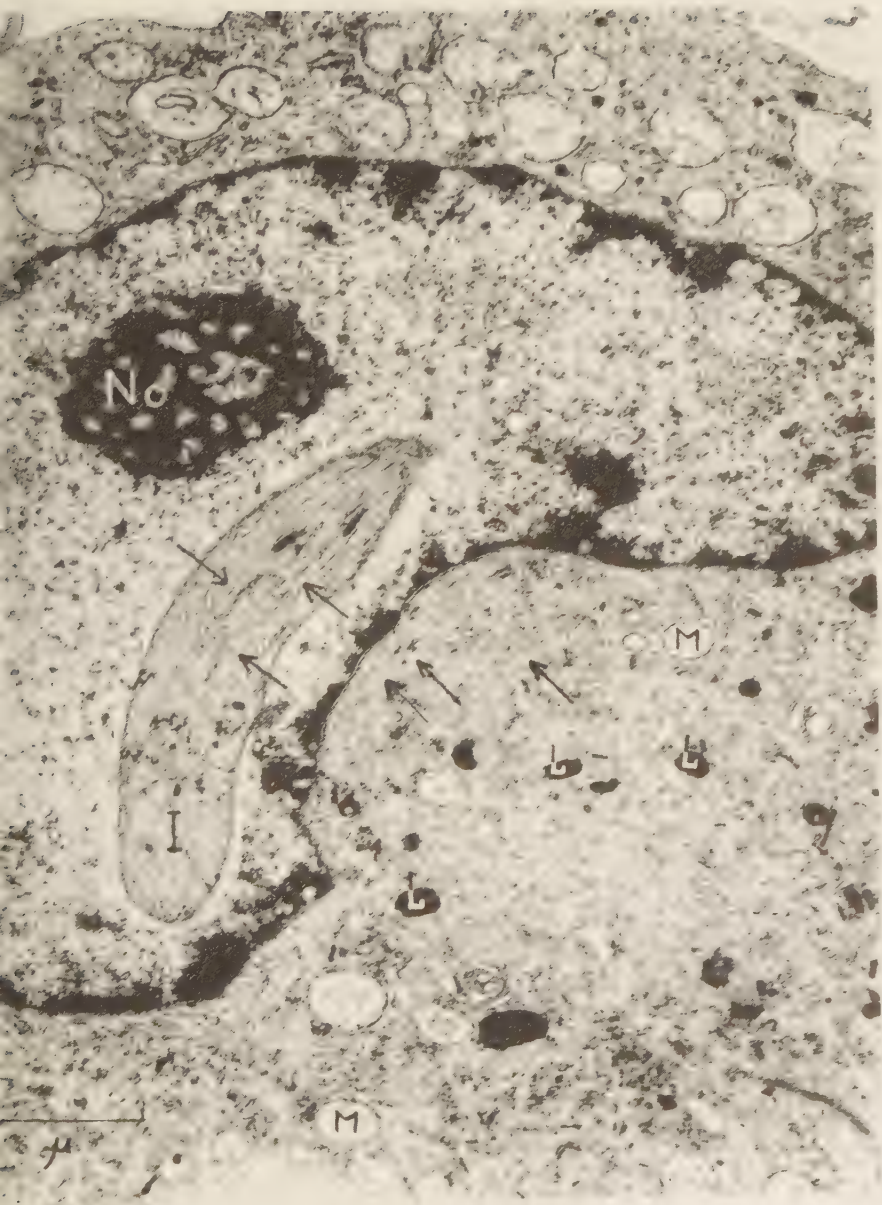


Abb. 9: Zelle aus der Monolayer-Kultur nach 2 Tagen

Kultivation. Der Zellkern enthält mehrere Inklusionen, die teils rein nervenfortsatzähnliches Material (F) beinhalten, teils aber vorwiegend rein cytoplasmatisch Material (CY). Darin Mikrotubuli und Filamente ($\uparrow$), vereinzelt "dense core granula"-ähnliche Gebilde (|) und Mitochondrien (M); C randständig gelagertes Chromatin, No Nukleolus. Auffällig der Organellenreichtum in den Inklusionen im Vergleich zum Cytoplasma. 1:35000

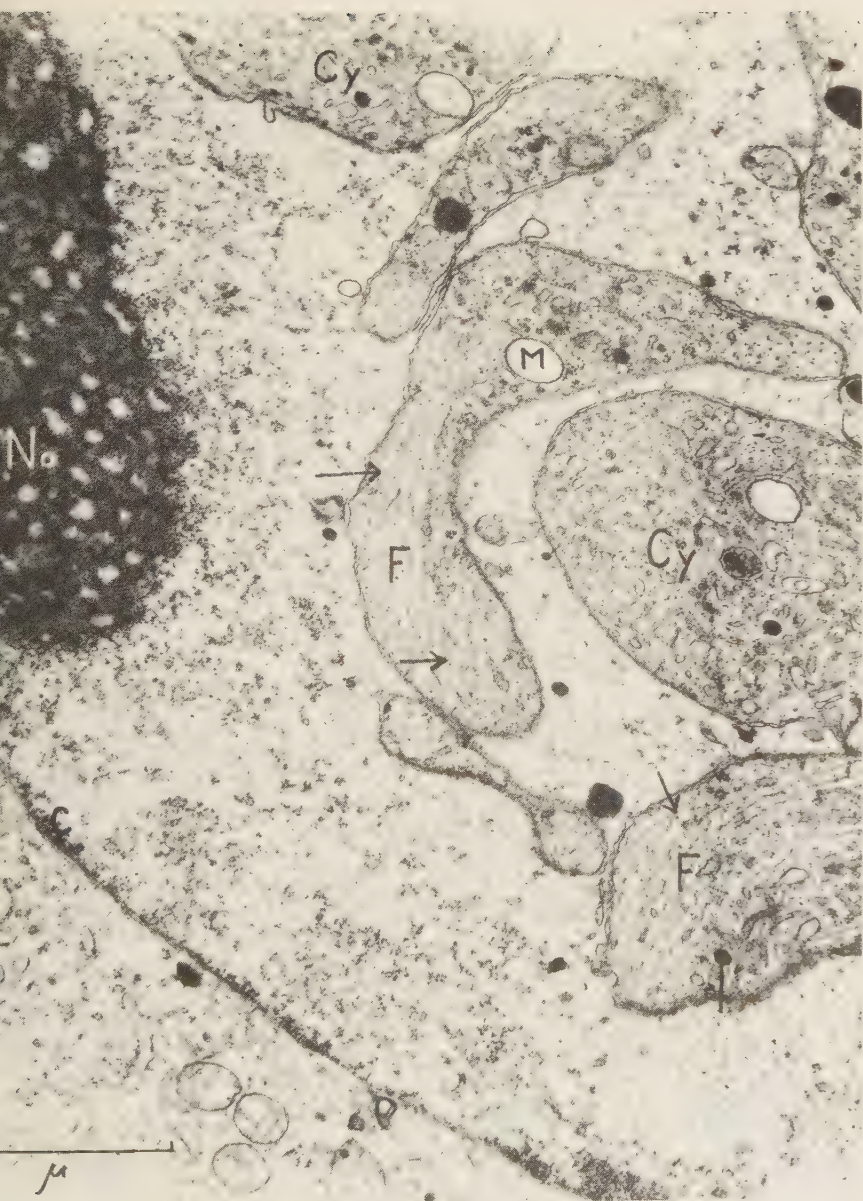


Abb. 10: Zelle aus der Deckglaskultur (5 Tage). Zellkern mit Pseudoinklusionen (↗), Inklusionen (I) und frei im Karyoplasma liegendem cytoplasmatischem Material (X). Starke Einfältelungen der Zellmembran (↓). 1:19000

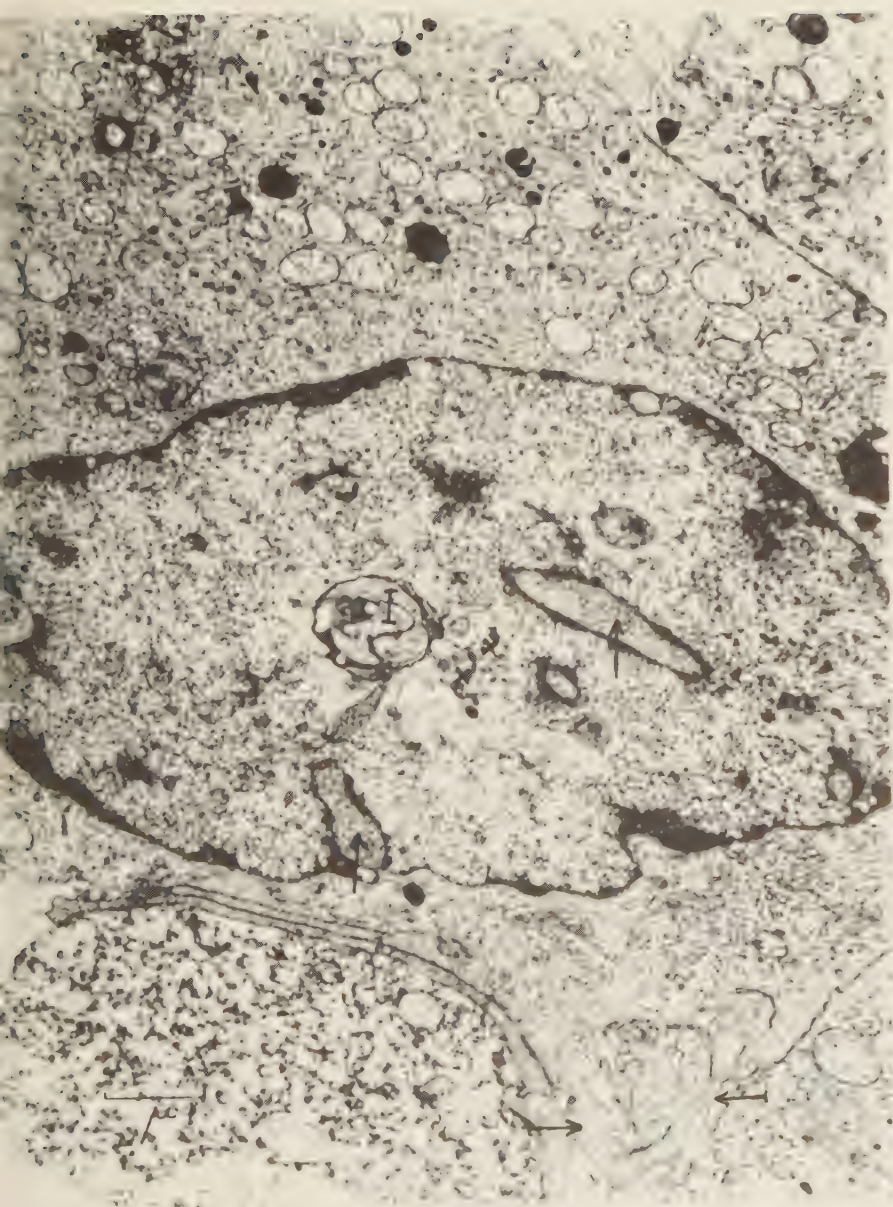


Abb. 11: Zelle aus der Deckglaskultur nach 5 Tagen Kultivation. Der Zellkern (K) ist nahezu vollständig von cytoplasmatischem Material ausgefüllt. Die die Inklusionen umgebenden Doppelmembranen (|) sind an vielen Stellen schon aufgelöst (↗), cytoplasmatisches Material liegt frei im Karyoplasma und ist schon lysosomal verändert (X).
M Mitochondrium von Karyoplasma umschlossen.
1:28000

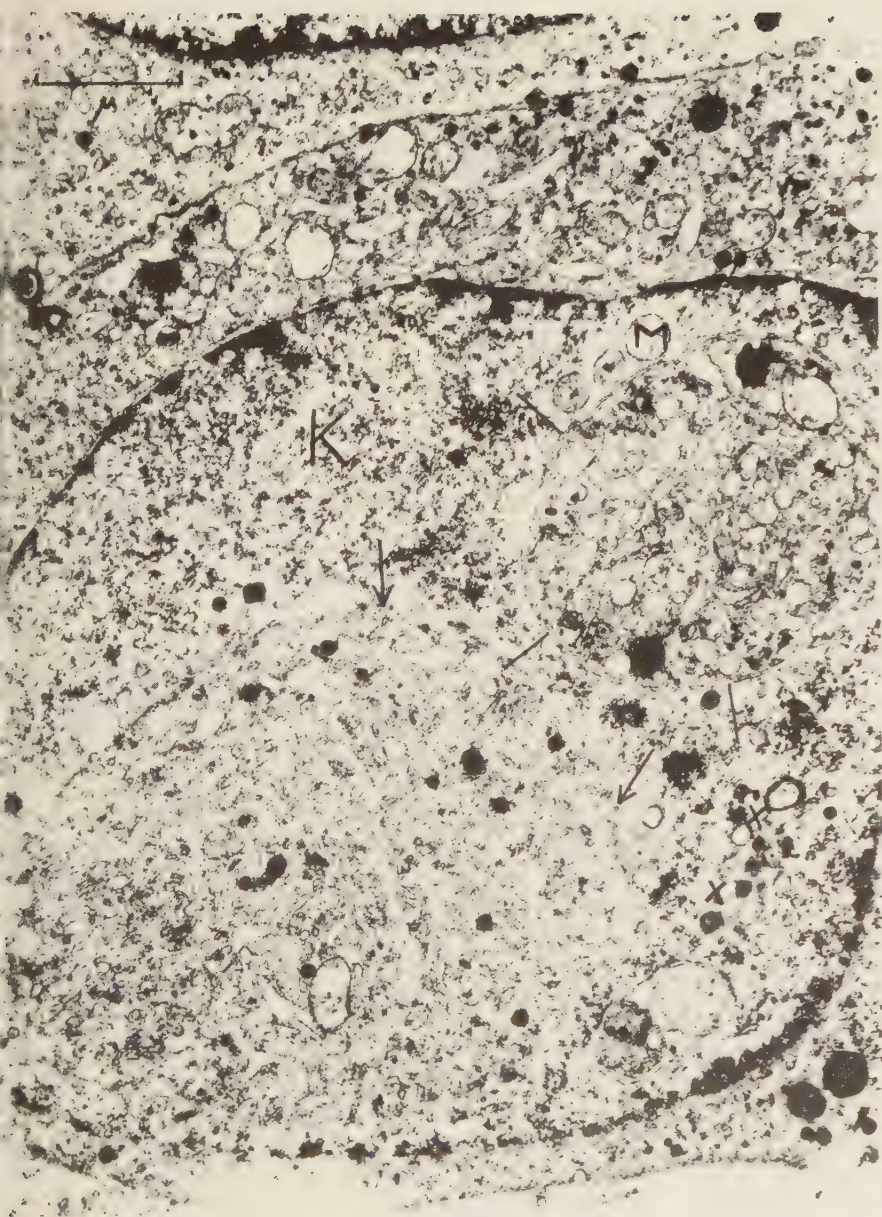


Abb. 12: Zelle aus der Organkultur nach 5 Tagen Kultivation.
Zellkern mit Pseudoinkclusionen (P), echten
Inklusionen (I) und Granula- und Membranstrukturen (↓).
In den Inklusionen, dort quergeschnitten, und in
Kernnähe Mikrofilamente (↗). No Nukleolus.
1:19000



Abb. 13: Zelle aus der Organkultur nach 5 Tagen Kultivation.
In Nähe des Zellkerns (N) plaques-artige Anordnung
von Viruspartikeln (A) auf der Oberfläche und in
den Hohlräumen des rauhen endoplasmatischen
Retikulums. Im Cytoplasma einige Lysosomen (L)
und viele membranbegrenzte Vesikel (X). 1:24000

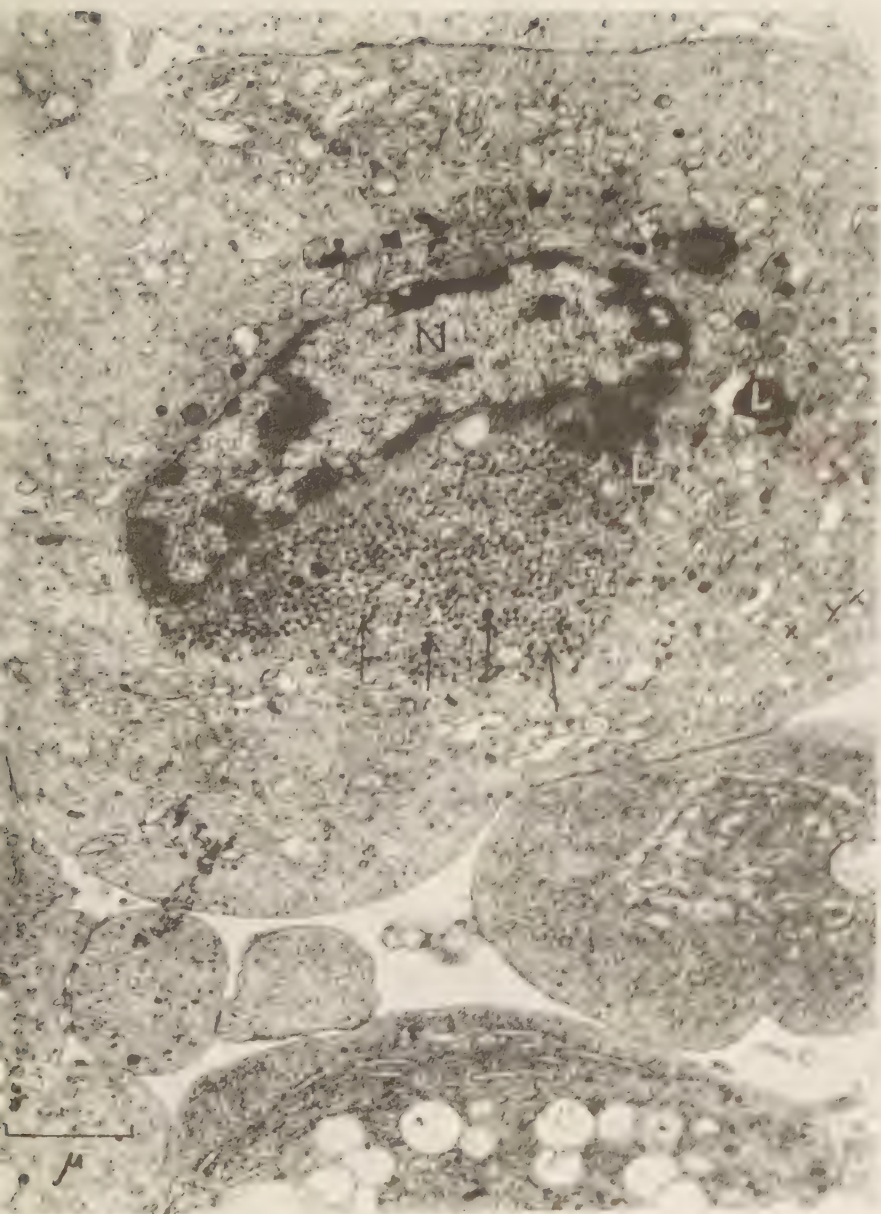


Abb. 14: Zelle aus der Organkultur nach 5 Tagen Kultivation.

Der Zellkern (N) weist größere Chromatinverdichtungen auf, die Kernmembran ist an einigen Stellen aufgelöst (X). In Nähe des Zellkerns wabige kristalline Strukturen (A). Die Mitochondrien (M) sind stark geschwollen, ihre innere Membran und die Cristae teilweise aufgelöst. 1:49000

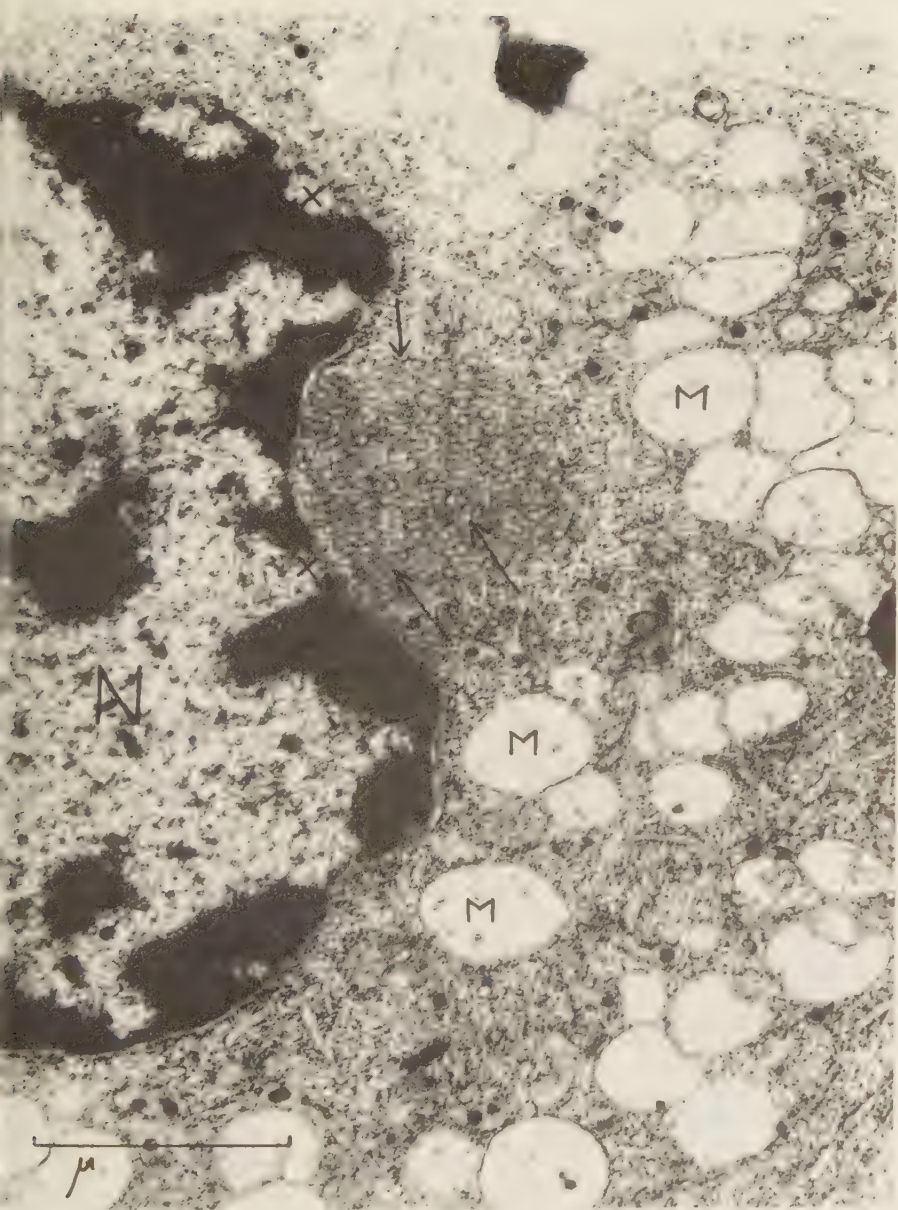


Abb. 15: Fortsatz aus der Deckglaskultur (5 Tage)
mit zahlreichen "dense core granula"-
ähnlichen Gebilden (♂).
1:24000



Abb. 16: Organkultur (5 Tage).

Neuropil-ähnliche Lagerung zahlreicher
Fortsätze (F_1 - F_4). 1:35000

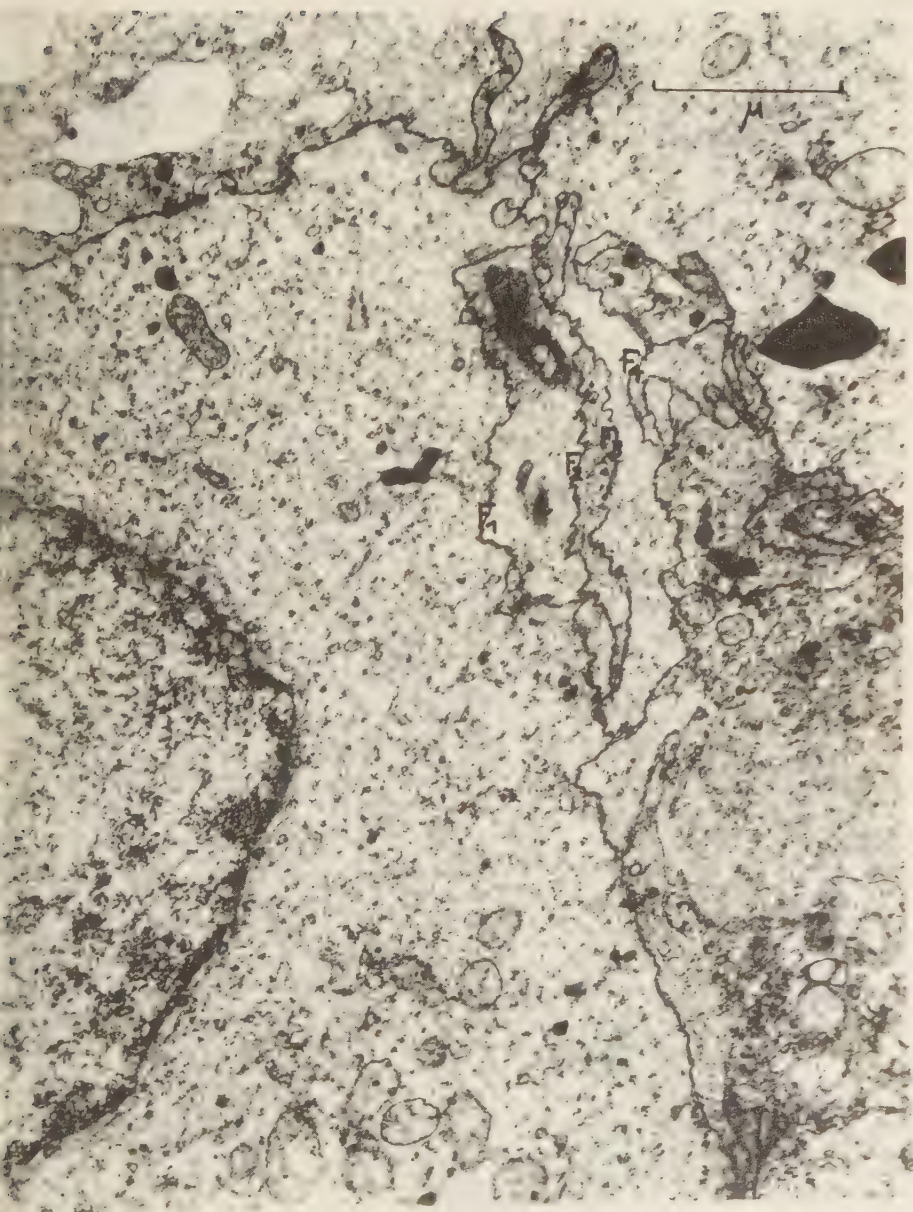


Abb. 17: Organkultur (5 Tage).

Lamellenartige Lagerung (X) einer
Oligodendroglia-ähnlichen Zelle.

D Dendriten-ähnlicher Fortsatz.

1:24000

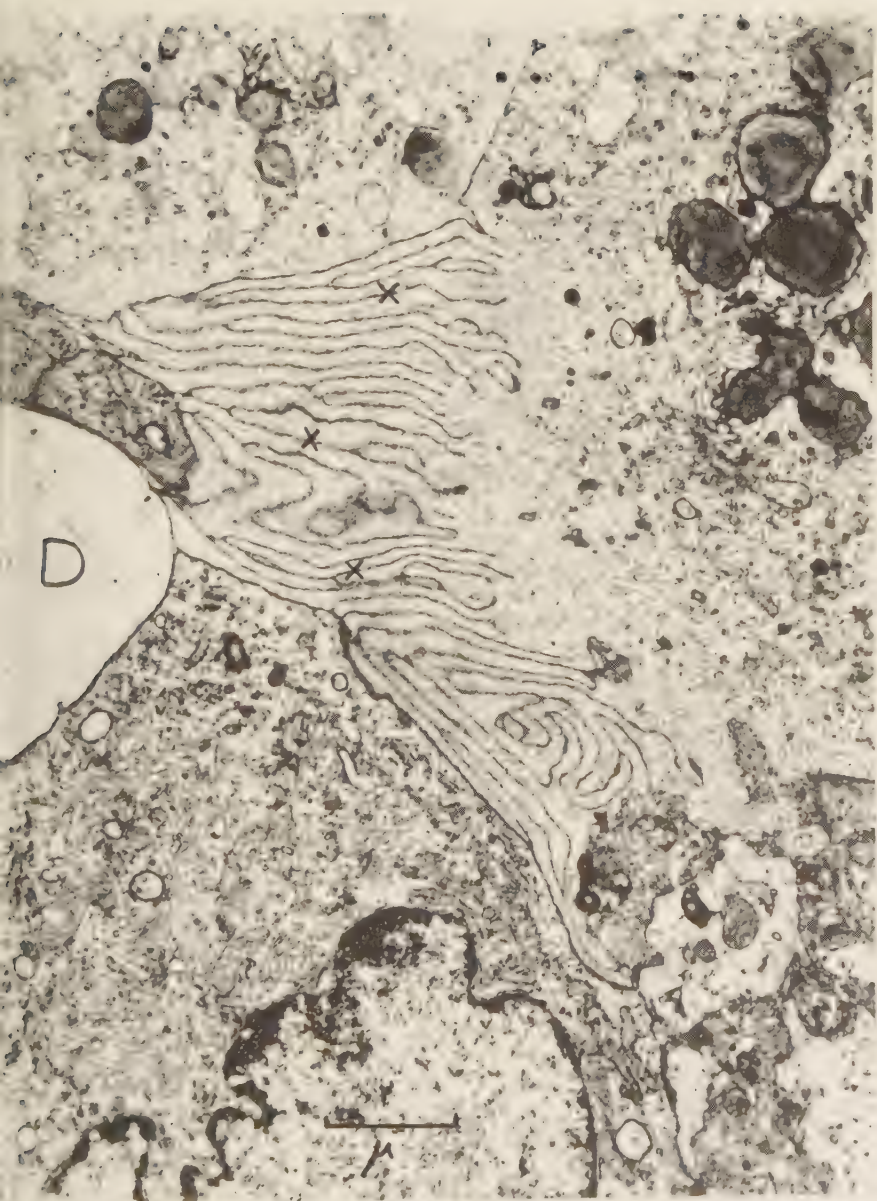


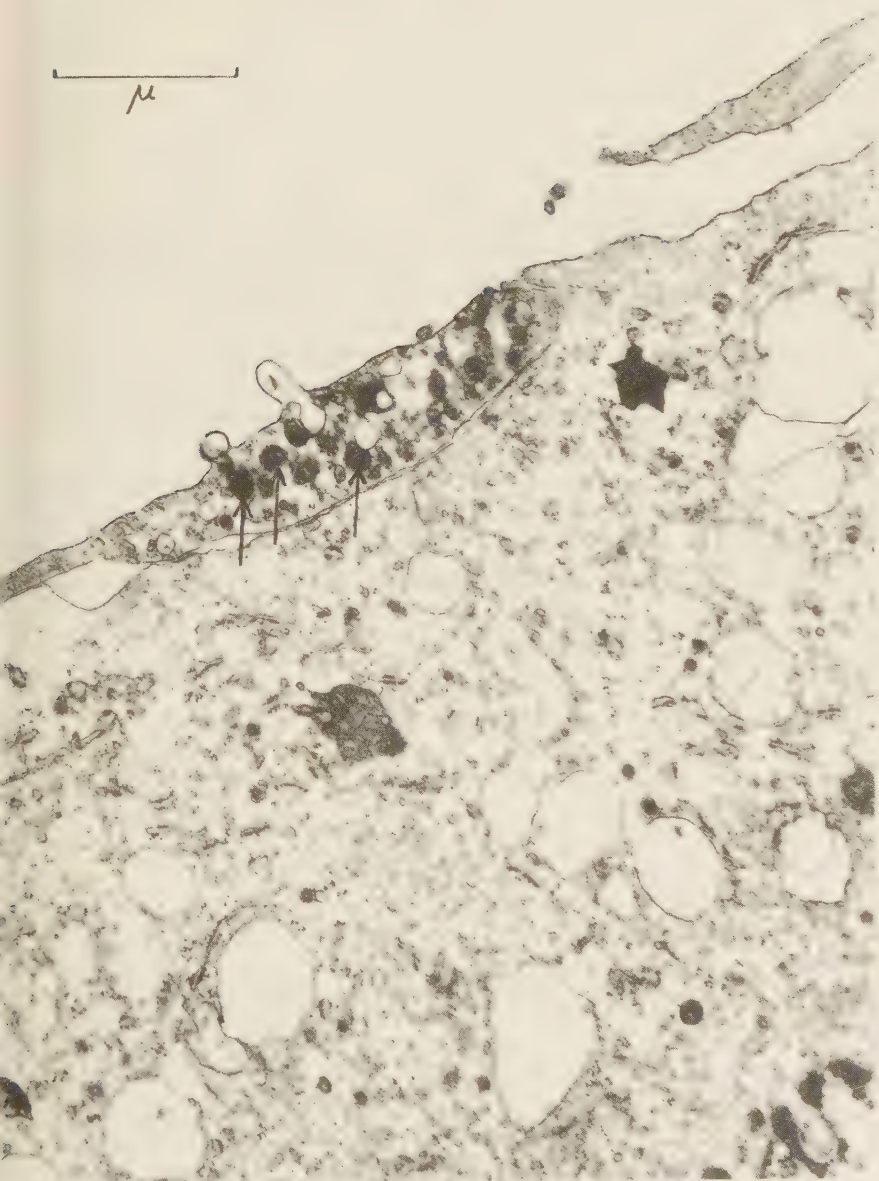
Abb. 18: Dendritenähnlicher Fortsatz (D) aus der Organ-
kultur (5 Tage). Angrenzende Zelle mit Zellkern (N)
und stark geschwollenen Mitochondrien (M).

1:42000



Abb. 19: Kolbig verdicktes Ende eines Fortsatzes aus der Monolayer-Kultur mit zahlreichen "dense core granula"-ähnlichen Gebilden. (↑). Die angrenzende Zelle zeigt autolytische Veränderungen im Cytoplasma. 1:35000

— μ —



Herrn Professor Dr. H.-J. Merker danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit.

Für die Anregung zu dieser Arbeit, Diskussion und nicht zuletzt Beschaffung des Materials danke ich Herrn Prof. Dr. H. Herken, Pharmakologisches Institut an der FU.

Mein Dank für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit gilt ebenfalls den Mitarbeitern und Assistenten des II Anat. Institutes der FUB, besonders Frau U. Krüger, Herrn Dr. med. W. Noack und Herrn B. Zimmermann.

Lebenslauf

Am 26. Juli 1945 wurde ich, Andreas Winter, als Sohn des Fotografen Helmut Winter und seiner Ehefrau Rose-Marie in Wolfenbüttel geboren. Nach vier Jahren Grundschule besuchte ich das Gymnasium Gifhorn, wo ich im Februar 1966 das Abitur bestand. Nach einem Semester Volkswirtschaft studierte ich Humanmedizin an der Freien Universität Berlin und bestand hier am 31. Juli 1972 das Staatsexamen mit der Note " sehr gut ". Anschließend arbeitete ich als Medizinalassistent im ehemaligen 2. Anatomischen Institut und fertigte unter Leitung von Prof. Dr. H.-J. Merker die vorliegende Dissertation an. Von Januar bis April 1973 Medizinalassistenzeit in der Inneren Medizin im Klinikum Westend und im Städt. Rudolf-Virchow-Krankenhaus.

